

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/US05/005890

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US  
Number: 60/547,848  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 23 March 2005 (23.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

1296920

# THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

*March 16, 2005*

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE.**

**APPLICATION NUMBER: 60/547,848**

**FILING DATE: February 27, 2004**

**RELATED PCT APPLICATION NUMBER: PCT/US05/05890**



Certified by

Under Secretary of Commerce  
for Intellectual Property  
and Director of the United States  
Patent and Trademark Office

**U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET**

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT  
under 37 C.F.R. §1.53(b)(2)

Atty. Docket: ZAGURY=8

22151 U.S. PTO  
60/547848



INVENTOR(S)/APPLICANT(S)			
LAST NAME	FIRST NAME	MI	RESIDENCE (CITY AND EITHER STATE OR FOREIGN COUNTRY)
ZAGURY	Jean-François		Paris, France
BOISSIER	Marie-Christophe		Paris, France
BESSIS	Natacha		Paris, France

☐ Additional inventors are being named on separately numbered sheets attached hereto

**TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)**

**Peptides of IL1 beta and TNF alpha and method of treatment using same**

**CORRESPONDENCE ADDRESS**

Direct all correspondence to the address associated with **Customer Number 001444**, which is presently:  
BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.  
624 Ninth Street, N.W., Suite 300  
Washington, D.C. 20001-5303

**ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)**

☒ Specification      Number of Pages      15      ☒ Applicant claims small entity status. See 37 C.F.R. §1.27

☐ Drawing(s)      Number of Sheets      ☐ Other (specify) \_\_\_\_\_

**METHOD OF PAYMENT (check one)**

☒ Credit Card Payment Form PTO-2038 is enclosed to cover the Provisional filing fee of  
☐ \$160 large entity      ☒ \$80 small entity

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees and credit Deposit Account Number 02-4035

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No ☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are:

Respectfully submitted,

BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.

By:

Allen C. Yun

Registration No.: 37,971

Date: February 27, 2004

ACY:pp

## **Peptides of IL1 beta and TNF alpha and method of treatment using same**

La présente invention concerne de nouveaux peptides dérivés des cytokines proinflammatoires l'interleukine 1 beta (IL1b) et Tumor Necrosis Factor alpha (TNFa) et leur application en thérapeutique humaine ou vétérinaire. Les maladies ciblées par ces applications thérapeutiques peuvent être notamment la polyarthrite rhumatoïde, le choc septique, la diabète auto-immun, le rejet du greffon contre l'hôte, mais aussi les maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, et plus généralement, les maladies liées à des surproductions des cytokines IL1b ou TNFa.

L'immunisation active anti-cytokine est une stratégie d'immunothérapie active développée depuis 1990 par Zagury et al. qui repose notamment sur la demande de brevet WO 92/22577. Cette idée a été reprise par plusieurs équipes scientifiques qui ont publié dans des revues scientifiques internationales des immunisations actives contre la protéine entière d'IFN $\alpha$  multimérisée par traitement au glutaraldéhyde (Gringeri et al, JAIDS 1999;20:358-70), une protéine TNF $\alpha$  chimérique consistant au couplage de la protéine native du TNF $\alpha$  avec un épitope T de l'ovalbumine (Dalum et al, Nature Biotechnology, 1999;17:666-69), contre de l'IL9 entière couplée avec du KLH (Richard et al, PNAS, 2000;97:767-72) ou encore de l'IL5 entière chimérique avec un épitope T de toxine tétanique (Hertz et al, J. Immunol, 2001;167:3792-99).

Ces approches ont confirmé la faisabilité d'immunisations autologues anti-cytokines, mais ces quelques succès cachent les essais infructueux décrits par certains auteurs : certaines cytokines ne permettent pas d'obtenir d'anticorps suffisamment protecteurs et d'effet clinique, et la même cytokine préparée sous une forme efficace d'une façon ne le sera pas sous une autre (Richard et al, PNAS, 2000;97:767-72).

En essayant d'expliquer ce phénomène, la demanderesse a observé que jusqu'à présent tous les auteurs ont utilisé des cytokines entières (éventuellement légèrement modifiées), ce qui entraîne des difficultés notamment aux niveaux suivants :

- dilution du pouvoir immunogène des déterminants antigéniques d'intérêt

- genèse possible d'anticorps facilitants in vivo (réponse B).
- genèse possible de réaction autoimmune contre des épitopes T potentiels présents dans la cytokine entière (réaction autoimmune T).

C'est pourquoi la demanderesse a précédemment revendiqué des familles de peptides de taille limitée entre 5 et 40 acides aminés issus de cytokines et qui présentent un pouvoir antigénique permettant de générer des anticorps contre la cytokine native (demande de brevet PCT/FR03/01120). EP-A-0218531 a aussi décrit des peptides d'IL1 utilisés pour la préparation d'anticorps.

La demanderesse a évalué certains peptides des cytokines IL1b et TNFa de taille compris entre 10 et 30 résidus et a démontré que ces peptides n'étaient pas seulement antigéniques, mais qu'ils étaient aussi efficaces comme immunogènes pour protéger *in vivo* contre des maladies liées aux surproductions de ces cytokines. La présente demande revendique donc des peptides de taille comprise entre 5 et 30 acides aminés, provenant des cytokines IL1b et TNFa murines, humaines ou de toute autre espèce de mammifère, et leur utilisation chez l'homme ou l'animal (dans ce cas application vétérinaire) pour prévenir ou traiter les maladies liées aux surproductions de ces cytokines. La présente demande revendique aussi la fabrication d'anticorps monoclonaux ou oligoclonaux à partir de ces peptides et l'utilisation de ces anticorps pour administration thérapeutique ou préventive chez l'homme, ou l'animal (application vétérinaire).

Les peptides de cytokine selon l'invention proviennent ou dérivent des cytokines IL1b et TNFa. Par "proviennent" l'on entend que leur séquence d'acides aminés est identique à celle de la cytokine. Par "dérivent" l'on entend que leur séquence d'acides aminés est majoritairement identique à celle de la cytokine mais peut comporter quelques différences comme on le verra ci-après.

Les peptides de cytokine ci-dessus comportent avantageusement plus de 5, notamment plus de 7, particulièrement plus de 9 et tout particulièrement plus de 11 acides aminés.

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention, les peptides de cytokine ci-dessus comportent moins de 30, avantageusement moins de 25, notamment moins de 20, plus particulièrement moins de 18 acides aminés.

La demanderesse a démontré que la zone peptidique :

80 VSRFAISYQEKVNLLS 95 de la cytokine murine TNFa permet d'engendrer des anticorps par immunisation active capables de bloquer le choc septique TNFa-dépendant chez la souris (Expérience 1). La séquence correspondante de la cytokine humaine est homologue à 75% :

80 ISRIAVSYQTKVNLLS 95

La demanderesse a aussi démontré que la zone peptidique :

121 YISTSQAEHKPVFLG 135 de la cytokine murine IL1b permet d'engendrer des anticorps par immunisation active capables de bloquer l'arthrite induite au collagène chez la souris (Expérience 2). La séquence correspondante chez l'homme est homologue à 80% :

121 YISTSQAENMPVFLG 135

Loetascher et al. (J Biol Chem, 1993, 268:26350-357) ont montré par des expériences de mutagenèse dirigée que la région 143-147 de TNFa pouvait être importante dans l'interaction avec le récepteur p55 de TNFa, et la présente invention revendique aussi l'immunisation contre des épitopes B de cette région au moyen de peptides présentant une homologie significative qu'ils soient xénogéniques ou mutants par rapport à la séquence de la cytokine humaine ou animale. La séquence correspondant à cette zone chez l'homme est :

140 DYLDFAESGQVY 150

et chez la souris :

140 KYLDFAESGQVY 150

Evans et al. (J Biol Chem, 1995, 270:11477-83) ont eux aussi expliqué par des expériences de mutagenèse dirigée que d'autres régions de l'IL1b pouvaient être importantes dans l'interaction avec le récepteur, et la présente invention revendique aussi l'immunisation contre des épitopes B de ces régions au moyen de peptides présentant une homologie significative qu'ils soient xénogéniques ou mutants par rapport à la séquence de la cytokine humaine ou animale ciblée. Les séquences correspondant à ces zones chez l'homme sont :

3 VKSLNCTLRDSQQKSL 18  
45 SFVQGEESNDKIP 57  
89 NYPKKKMEKRFVFNKIEI 106  
143 ITDFTMQFVSS 153

et chez la souris :

3 IRQLHYRLRDEQQKSL 18  
45 SFVQGEPSNDKIP 57  
89 QYPKKKMEKRFVFNKIEV 106  
142 IIDFTMESVSS 152

Des anticorps autologues ont pu être créés contre ces derniers peptides de souris par immunisation active.

Les expériences 1 et 2 ci-après, réalisées par la demanderesse, démontrent la capacité thérapeutique *in vivo* de l'approche d'immunisation active anti-peptides avec des peptides de taille inférieure à 30 résidus. La demanderesse revendique ces peptides et leurs dérivés pour réaliser aussi des immunisations actives permettant de générer des anticorps ciblant ces épitopes des cytokines TNFa et IL1b pour bloquer l'interaction de la cytokine à son récepteur.

Comme le sait l'homme de l'art de l'immunologie, des modifications des enchaînements peptidiques naturels sont possibles sans pour autant modifier la nature des propriétés immunologiques des peptides immunogènes. On peut donc citer également les dérivés de ces peptides de cytokine qui sont fortement homologues à ces séquences naturelles, par exemple ayant plus de 50% d'homologie, en particulier plus de 70% d'homologie, et de préférence plus de 80% d'homologie ou même plus de 90% d'homologie avec le peptide correspondant ou avec un fragment de ce peptide, tout en conservant les propriétés immunologiques du site épitopique du peptide natif. En particulier on pourra utiliser des séquences homologues de cytokines d'autres mammifères pour obtenir une réaction protectrice xénogénique et non pas seulement autologue chez un animal ou chez l'homme.

Les dérivés des peptides de cytokine peuvent contenir des résidus modifiés, à condition que les modifications n'abaissent pas sensiblement l'immunogénicité, soit par addition de radicaux chimiques (méthyle, acétyle etc...) soit par modification stéréochimique (utilisation d'acides aminés de série D). Les

dérivés peptidiques de cytokine doivent, comme les peptides de cytokine induire des anticorps interagissant avec la cytokine.

Les dérivés peptidiques de cytokine selon l'invention peuvent comporter une ou plusieurs modifications dans les acides aminés dont ils sont constitués telles que des délétions, substitutions, additions, ou fonctionnalisations (telles qu'acylation) d'un ou plusieurs acides aminés, dans la mesure où ces modifications restent dans le cadre précisé ci-dessus (caractères immunologiques). Par exemple, en général le remplacement d'un résidu leucine par un résidu isoleucine ne modifie pas de telles propriétés ; les modifications doivent généralement concerner moins de 40% d'acides aminés, notamment moins de 30% de préférence moins de 20% et tout particulièrement moins de 10% des acides aminés du peptide naturel. Il est important que les anticorps induits par les peptides modifiés soient actifs vis à vis de la cytokine native.

Ces modifications sont à la portée de l'homme de l'art qui peut vérifier l'incidence des modifications par des tests simples. L'immunogénicité de tels dérivés modifiés peut être évaluée par ELISA après immunisation de souris, l'antigène testé par ELISA étant la cytokine entière ou le peptide de cytokine immunisant, ou par des tests de blocage de la liaison cytokine-récepteur. Les éventuelles modifications affectent de préférence moins de 8 acides aminés, avantageusement moins de 6 acides aminés, notamment moins de 4 acides aminés, et particulièrement 3 acides aminés ou moins comme 2 ou 1 seul acide aminé.

L'invention a encore pour objet un composé caractérisé en ce qu'il renferme au moins un peptide de cytokine ou dérivé de peptide de cytokine ci-dessus. Un tel composé peut comprendre des répétitions de peptides/dérivés identiques, ou des combinaisons de peptides/dérivés différents, que ce soit sous forme linéaire ou sous forme de structure en candélabre ou de couplages mixtes à des protéines porteuses. Un tel composé peut également se présenter sous forme cyclisée. Ainsi des peptides de cytokine ou les dérivés peptidiques de cytokine selon l'invention peuvent par exemple être insérés dans des séquences plus longues d'acides aminés donnant notamment une meilleure conformation ou combinés à des épitopes T exogènes (que ce soit pour des immunisations protéiques ou par ADN).



Ils peuvent avantageusement être associés de manière covalente à des protéines porteuses comme par exemple le KLH.

Les peptides de cytokine selon l'invention, de par leur taille limitée, correspondent en général à un petit nombre d'épitopes de la cytokine. Lorsqu'ils sont notamment insérés, combinés ou associés, les composés ci-dessus ne comportent pas d'autres épitopes de ladite cytokine.

Ces peptides de cytokine ou dérivés de cytokine pourront être inclus dans toute séquence de protéine qui ne comprendra pas d'homologie avec les autres épitopes de la cytokine naturelle. Par exemple, on pourra ajouter aux extrémités une cystéine pour conférer au peptide une structure cyclique. Un autre exemple est un peptide entouré de séquences d'épitopes T de la toxine tétanique. Encore un autre exemple pourra comprendre un peptide correspondant à la séquence du site de liaison au récepteur mais où certains acides aminés sont remplacés par leurs isomères de série D afin d'éviter leur effet agoniste. En effet, il pourra être éventuellement avantageux d'utiliser des dérivés peptidiques qui n'ont pas d'activité agoniste sur le récepteur afin que l'immunogène ne puisse pas interférer avec la réponse immunitaire.

De façon à augmenter la réponse immunitaire, ces peptides de cytokine ou dérivés de cytokine pourront être couplés à des protéines porteuses. Les méthodes de couplages et la protéine porteuse considérées pourront être différentes selon le peptide ciblé : il pourra s'agir par exemple de la protéine Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) et Tetanus Toxoid (TT) conjugués aux peptides par des méthodes chimiques bien connues de l'homme de l'art comme celles de couplage par le carbodiimide, ou par le glutaraldéhyde ou par la benzidine bis-diazotée. La réalisation de ces couplages pourra être facilitée par l'addition ou l'incorporation d'acides aminés à la séquence comme par exemple des lysines, des histidines, des tyrosines ou des cystéines. De tels composés peptidiques couplés à un épitope T exogène (provenant de *plasmodium falciparum*, de KLH, etc..) que ce soit de manière chimique ou de manière génétique entrent aussi dans le cadre de l'invention.

Des couplages en réseau de type en candélabre ou à des molécules telles que la transferrine ou la ferritine peuvent être aussi mis en œuvre pour stimuler efficacement la réponse immunitaire.

Les peptides selon l'invention peuvent être notamment produits par synthèse chimique ou par génie génétique ou par tout autre méthode adaptée. La synthèse de peptides cycliques, au besoin en greffant un ou plusieurs acides aminés en bout de chaîne comme des cystéines pour créer un pont disulfure permet de retrouver une partie de la structure secondaire que ces fragments peptidiques possèdent dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

Les peptides selon l'invention possèdent de très intéressantes propriétés pharmacologiques. Ils sont doués notamment de remarquables propriétés anti-cytokines. Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale. Elles justifient l'utilisation des peptides ci-dessus décrits à titre de médicament.

C'est pourquoi l'invention a encore pour objet des médicaments caractérisés en ce qu'ils sont constitués des peptides ou dérivés des cytokines IL1b ou TNFa ou composés tels que définis ci-dessus, c'est à dire des peptides de cytokine ou dérivés de cytokine ou composés immunogènes tels que définis ci-dessus pour leur utilisation dans une méthode de traitement thérapeutique du corps humain ou animal, ainsi que l'utilisation d'un tel peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène pour la préparation d'un médicament curatif ou préventif destiné au traitement ou à la prévention des affections liées à un excès ou à la présence de cytokines.

Les médicaments selon la présente invention trouvent leur emploi par exemple dans le traitement tant curatif que préventif des maladies liées aux dérèglements de cytokines, que ce soit la polyarthrite rhumatoïde, le choc septique ou toute autre maladie où le blocage de IL1b ou de TNFa est curatif. Ce ne sont là que quelques exemples, et l'invention a aussi pour objet tout traitement du corps humain ou animal, basé sur une immunisation active (ADN ou peptide) impliquant les séquences peptidiques mentionnées ci-dessus à l'exclusion des autres épitopes des cytokines. Ces séquences pourront être modifiées comme indiqué dans la présente description, et les immunisations par ADN se feront par simple traduction à partir du code génétique.

La réponse immunitaire humorale pourra être évaluée par des tests ELISA.

Les principes actifs immunogènes selon l'invention peuvent être utilisés comme suit :

On administre à un patient ou à un animal un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène selon la présente invention, par exemple par voie sous-cutanée ou intramusculaire, en quantité suffisante pour être efficace sur le plan thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée peut aller par exemple de 1 à 1000 µg, notamment 10 à 500 µg par voie sous-cutanée, une fois par mois pendant trois mois, puis périodiquement en fonction du taux des anticorps sériques induits, par exemple tous les 2-6 mois. On pourra administrer dans une même préparation deux molécules immunogènes des deux cytokines si l'on souhaite obtenir un effet bloquant encore plus fort.

L'invention a aussi pour objet les compositions pharmaceutiques notamment les vaccins qui renferment au moins un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène précité, à titre de principe actif.

À titre de médicaments, un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène de l'invention peut être incorporé dans des compositions pharmaceutiques destinées à n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intramusculaire, par voie intraveineuse ou par voie orale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain intervalle de temps.

C'est pourquoi la présente demande a également pour objet une composition pharmaceutique, curative ou préventive, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, un ou plusieurs peptides de cytokine ou dérivés de cytokine ou composés immunogènes, tel que définis ci-dessus.

L'agent immunogène peut être conditionné seul ou mélangé à un excipient ou mélange d'excipients pharmaceutiquement acceptables tel qu'un adjuvant. La présente demande a plus particulièrement pour objet un vaccin contenant à titre d'immunogène, un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition ci-dessus décrite, caractérisé en ce que l'on mélange, selon des

méthodes connues en elles mêmes, le ou les principes actifs avec des excipients acceptables, notamment pharmaceutiquement acceptables.

L'administration à un patient d'un un peptide ou dérivé de cytokine ou composé immunogène selon l'invention correspond à une immunothérapie active.

Il peut être intéressant également de procéder à une immunothérapie passive, c'est à dire de fournir à un patient ou à un animal malade directement des anticorps dont il a besoin. Pour cela, les peptides, dérivés et composés définis précédemment pourront être utilisés pour fabriquer des anticorps monoclonaux selon les techniques usuelles, humains, murins ou humanisés, par exemple par transformation de lymphocytes B de sujet immunisé par le virus d'Epstein-Barr ou par le criblage de banques d'anticorps. Ces anticorps en ciblant les épitopes des peptides ci-dessus bloqueront l'interaction de la cytokine avec son récepteur et permettront ainsi de diminuer l'effet pathogène de la cytokine dans la maladie. On pourra aussi préparer des anticorps oligoclonaux par immunisation active chez un animal comme le cheval par exemple, les purifier, et les administrer à titre thérapeutique à l'homme ou à un animal.

Les préparations vaccinales pourront être conditionnées pour la voie intra nasale sous forme de gel avec comme excipient le carbopol, de gouttes nasales ou de spray et pour la voie orale sous forme de capsules gastrorésistantes, de dragées ou de granules gastrorésistants.

Dans le cas de vaccin ADN administré par voie systémique ou mucosale, la présentation galénique du plasmide pourra être une suspension dans un liquide physiologique tel le PBS physiologiques (tampon phosphate = PBS). Les plasmides pourront être inclus dans des microsphères de polymères biodégradable (PLG, PLA, PCL) et administrées dans des capsules gastrorésistantes pour ingestion (voie orale). L'ADN pourra également être exprimé dans un vecteur vivant bactérien, type salmonelle ou viral type adénovirus ou poxvirus.

La présente demande a enfin pour objet un procédé d'immunisation active de patients caractérisé en ce que l'on utilise à titre d'immunogène un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène tel que défini ci-dessus avantageusement associé à un adjuvant d'immunité minéral, huileux ou de synthèse.

Les immunisations pourront se faire classiquement notamment par des peptides ou des composés immunogènes comme des conjugués de préférence en présence d'un adjuvant, par exemple l'ISA 51 ou l'Alun. Les immunisations pourront se faire à base d'ADN (séquences homologues aux sites de liaison combinées avec des épitopes T exogènes) en utilisant de l'ADN nu ou un vecteur d'expression contenant un promoteur adapté comme par exemple le pCR3.1. Les ADN administrés pourront être protégés des nucléases par l'utilisation de radicaux adéquats (CpG etc.). On pourra notamment faire suivre une immunisation initiale par ADN par des rappels classiques à l'aide des composés peptidiques.

Les méthodes de traitement du corps humain ou animal décrites dans ce brevet peuvent inclure un peptide de cytokine ou dérivé de cytokine ou composé immunogène tel que défini ci-dessus, et peuvent inclure les anticorps monoclonaux ou oligoclonaux tels que définis ci-dessus.

Les conditions préférentielles de mise en œuvre des peptides ci-dessus décrits s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus.

La figure 1 et la figure 2 donnent les résultats de protection in vivo des immunisations décrites dans les expériences 1 et 2 pour un peptide TNF $\alpha$  dans le choc septique TNF-adpéendant et un peptide IL1b dans l'arthrite au collagène.

Les expériences qui suivent illustrent la présente invention.

#### **Expérience 1 :**

4 peptides de TNF $\alpha$  murin couplés à la protéine porteuse KLH, dont le peptide cyclisé CVSRFAISYQEKVNLLSC appelé TNF $\alpha$ -6, ont été testés dans un modèle de choc endotoxinique. Pour cela, les souris Balb/c ont été préimmunisées contre ces peptides à J0, J8, J16, et J40. Au jour 50, les souris ont été soumises au choc, c'est à dire qu'on leur a injecté du LPS avec du Galactosamine. Le contrôle était fait de souris immunisées contre du KLH seul.

Le résultat est représenté sur la figure ci-après :

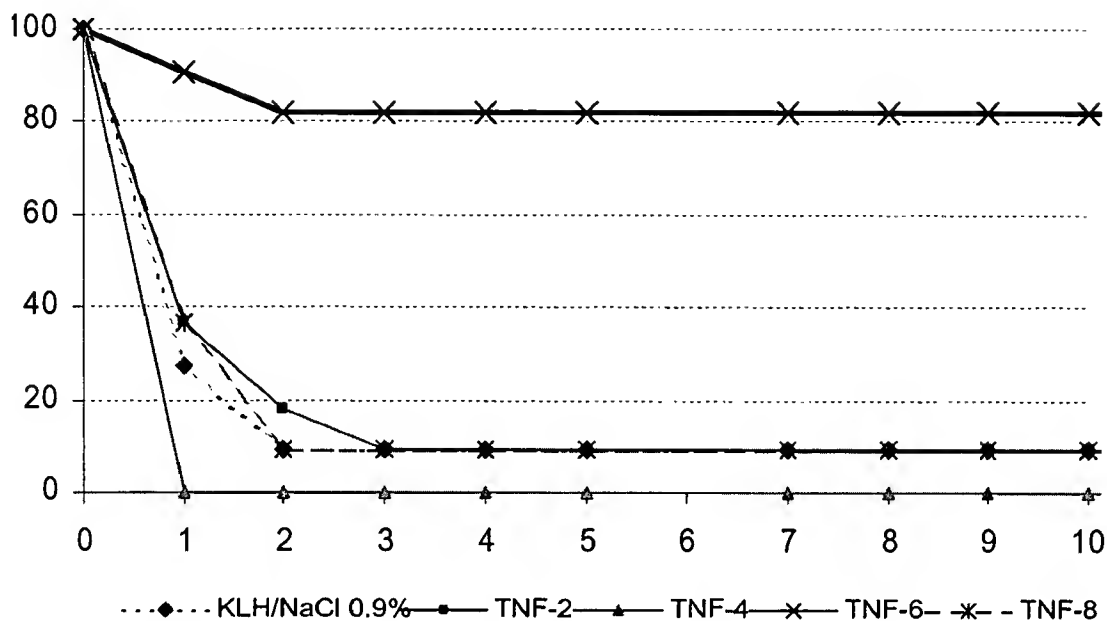


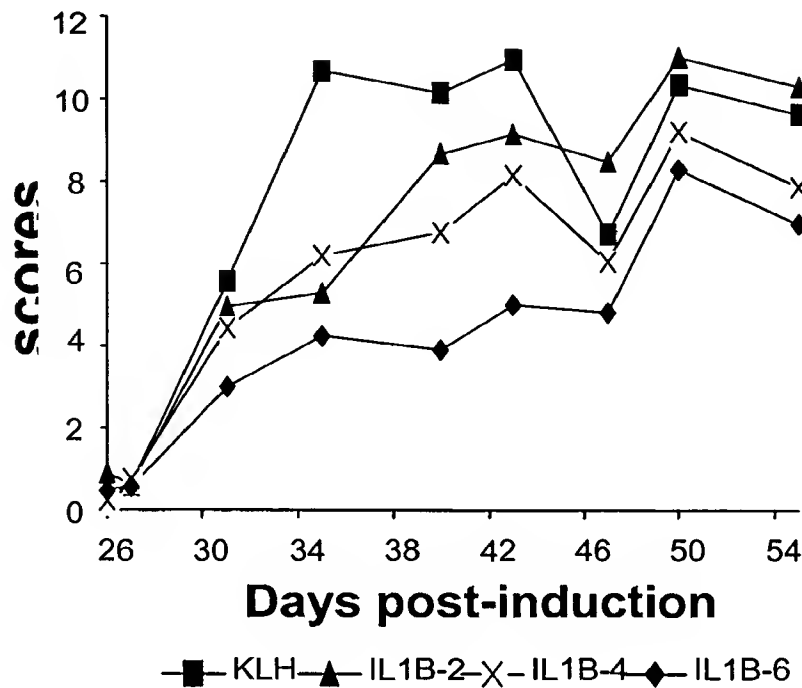
Figure 1 : survie des souris soumises à un choc septique

On constate que toutes les souris meurent après deux jours, sauf pour le groupe immunisé contre le peptide  $\text{TNF}\alpha$ -6 où les souris sont protégées. La protection conférée par l'immunisation est très significative ( $p=0,008$ ).

### Expérience 2 :

3 peptides de l' $\text{IL1}\beta$  murine couplés à la protéine KLH, dont le peptide  $\text{IL1}\beta$ -6 cyclisé de séquence YCYISTSQAEHKPVFLGC, ont été testés dans un modèle d'arthrite au collagène. Pour cela, des souris DBA1 ont été préimmunisées contre ces peptides à J0, 20, 40, 60. Au jour 80 les souris ont été immunisées contre du collagène en adjuvant de Freund, et de même au jour 95. Le développement de l'arthrite a été suivie entre le jour 100 et le jour 160 : deux fois par semaine, les souris sont examinées et un score leur est attribué en fonction de l'état d'inflammation de leurs articulations (0=pas d'inflammation, 1 = inflammation légère, 2=inflammation

moyenne, 3=inflammation forte). Le résultat est représenté sur la figure 2 ci-après :



**Figure 2 :** Scores cliniques moyens des groupes de souris.

On constate que les souris contrôle immunisées par KLH seul font une forte inflammation (courbe à carrés) alors que le groupe de souris immunisées contre le peptides IL1 $\beta$ -6 (courbe à losanges) présente un fort taux de protection par rapport au contrôle ( $p=0,0003$ , test ANOVA).

### Expérience 3.

On immunise 6 groupes de 4 souris contre 20 ug des peptides de l'IL1b murine IRQLHYRLRDEQQKSL (groupe 1), SFVQGEPsNDKIP (groupe 2), QYPKKKMEKRFVFNKIEV (groupe 3), IIDFTMESVSS (groupe 4), et 20 ug du peptide TNFa murin KYLDFAESGQVY (groupe 5) tous couplés au KLH. Le groupe 6 correspond à des souris immunisées par KLH seul. Un rappel est réalisé à J20 et J40. A J50 les souris sont sacrifiées et on mesure les anticorps dirigés contre la

cytokine native mTNFa et la cytokine native mIL1b dans les serums par un test ELISA.

Les moyennes obtenues pour chaque groupe sont indiquées dans le tableau ci-après.

	Réponse anti-TNFa	Réponse anti-IL1b
	Moyenne	Moyenne
Groupe 1	0,13	1,5
Groupe 2	0,15	1,9
Groupe 3	0,18	1,6
Groupe 4	0,12	0,8
Groupe 5	1,3	0,31
Groupe 6	0,10	0,15

On voit donc que ces peptides sont bien capables d'induire des anticorps reconnaissant la cytokine native. Ces anticorps sont bien spécifiques vu qu'ils reconnaissent seulement la cytokine dont la séquence a été utilisée pour l'immunisation.

### REVENDEICATIONS

1. Un peptide provenant des cytokines de mammifère IL1b ou TNFa, homologue à un peptide suivant des cytokines humaines IL1b ou TNFa :

80 ISRIAVSYQTKVNLLS 95

140 DYLDFAESGQVY 150

3 VKSLNCTLRDSQQKSL 18

45 SFVQGEESNDKIP 57

89 NYPKKKMEKRFFVNKIEI 106

121 YISTSQAENMPVFLG 135

143 ITDFTMQFVSS 153

2. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine TNFa est ISRIAVSYQTKVNLLS



3. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine TNFa est DYLDFAESGQVY
4. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine IL1b est VKSLNCTLRDSQQKSL
5. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine IL1b est SFVQGEESNDKIP
6. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine IL1b est NYPKKKMEKRFVFNKIEI
7. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine IL1b est YISTSQAENMPVFLG
8. Un peptide selon la revendication 1 sachant que la séquence de cytokine humaine IL1b est ITDFTMQFVSS
10. Un dérivé des peptides selon la revendication 1 à 9.
11. Un peptide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il comporte moins de 30 acides aminés.
12. Un dérivé d'un peptide tel que défini à l'une des revendications 1 à 11 par délétion, substitution, addition, cyclisation, modification stéréochimique (utilisation d'acides aminés de série D) ou fonctionnalisation (telle qu'acylation) d'un ou plusieurs acides aminés dudit peptide.
13. Un composé immunogène caractérisé en ce qu'il comprend un peptide ou dérivé d'un peptide tel que défini à l'une des revendications 1 à 12, étant entendu qu'il ne comporte pas d'autres épitopes de ladite cytokine et en ce qu'il est capable de générer chez un sujet des anticorps reconnaissant la cytokine native.
14. Un peptide ou dérivé d'un peptide ou composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 13 pour son utilisation dans une méthode de traitement préventif ou thérapeutique du corps humain.
15. Un peptide ou dérivé d'un peptide ou composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 13 pour son utilisation dans une méthode de traitement préventif ou thérapeutique du corps animal (vétérinaire).
16. Utilisation d'un peptide ou dérivé d'un peptide ou composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un

médicament curatif ou préventif destiné au traitement ou à la prévention des affections liées à un excès ou à la présence de cytokines.

17. Une composition pharmaceutique qui renferme au moins un peptide ou dérivé d'un peptide ou composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 15 à titre de principe actif.

18. Fabrication d'anticorps monoclonaux ou oligoclonaux à partir des peptides définis dans les revendications 1 à 15.

19. Utilisation des anticorps tels que définis en revendication 18 pour le traitement préventif ou thérapeutique du corps humain ou animal.

20. Une méthode de traitement ou prévention des maladies associées à la surproduction pathogènes d'IL1b et de TNFa qui comprend l'administration d'un peptide ou dérivé d'un peptide ou composé immunogène tel que défini à l'une des revendications 1 à 15.

21. Une méthode de traitement des maladies associées à la surproduction pathogènes d'IL1b et de TNFa qui comprend l'administration d'anticorps tels que définis en revendication 18.